

PENGUNAAN PUPUK ORGANIK CAIR SEBAGAI MEDIA PRODUKSI INOKULAN *Azotobacter chroococcum*

R. Hindersah., H. Yulina, dan A. Nurbaity

Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran
Jalan Raya Bandung-Sumedang Km. 21 Jatinangor 43565
Email: reginawanti@unpad.ac.id

ABSTRAK

Pupuk hayati berbasis *Azotobacter chroococcum* telah banyak digunakan dalam produksi tanaman yang ramah lingkungan. Untuk skala komersial, pemilihan media perbanyakan yang murah menjadi penting karena akan mempengaruhi kualitas dan harga jual pupuk. Media perbanyakan bakteri *Azotobacter* harus mendukung perkembangan sel dan juga aktivitas fiksasi N₂ dan produksi fitohormon. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah pupuk organik cair (POC) rendah N dapat digunakan sebagai media perbanyakan sel *A. chroococcum* tanpa menurunkan daya hidup bakteri serta aktivitasnya dalam memfiksasi N₂ dan memproduksi fitohormon. POC umumnya mengandung unsur hara lengkap meskipun kuantitasnya kecil. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen Rancangan Acak Lengkap yang menguji dua jenis POC komersial. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua jenis POC hanya mampu mendukung pertumbuhan sel sampai 72 jam dan pada 96 jam viabilitas sel di kedua POC mulai menurun dibandingkan dengan pada media kontrol Ashby. Pada inokulan cair umur 72 jam konsentrasi N total maupun hormon sitokinin inokulan cair di kedua media POC lebih rendah daripada di media Ashby. Penelitian ini menunjukkan bahwa POC komersial dapat digunakan untuk media perbanyakan *A. chroococcum* tetapi tanpa optimasi komposisi, kepadatan sel dan konsentrasi sitokinin masih lebih rendah daripada POC dengan media Ashby.

Kata kunci: *Azotobacter chroococcum*, Pupuk Organik Cair, Media Produksi

USE OF LIQUID ORGANIC FERTILIZER AS A MEDIUM OF *Azotobacter chroococcum* INOCULANT PRODUCTION

ABSTRACT

Azotobacter chroococcum based biofertilizers have been widely used in the production of environmentally agriculture. For commercial scale, cheap growth media for *Azotobacter* inoculant will affect the quality and price of liquid biofertilizer. Growth medium should support cell proliferation as well as its nitrogen fixation and phytohormone production. The objective of this study was to determine whether liquid organic fertilizer (LOF) containing low N can be used as a medium for scaling up *A. chroococcum* inoculant without lowering the survival of bacteria and its activity in N₂ fixation and phytohormones production. LOF generally contains a complete nutrient although in a small quantities. Experiment was set up in completely randomized design which tested two types of commercial LOF. The results showed that both of LOF were only able to support cell growth up to 72 hours and at 96 hours cell viability began to decline compared to the control medium, free-N Ashby. At 72 hour total N and cytokinin concentration in LOF was lower than those in Ashby media. This study revealed that LOF could be used as *A. chroococcum* growth media, but without optimization of its composition, cell density and cytokinin content would be lower than those of inoculant in Ashby Media.

Kata kunci: *Azotobacter chroococcum*, Liquid organic biofertilizer, Production media

PENDAHULUAN

Semakin meningkatnya harga pupuk kimia bersubsidi dirasakan menjadi beban bagi para petani, sehingga dibutuhkan

alternatif lain yang dapat memenuhi permintaan akan kebutuhan pupuk. Beberapa rizobakteria dapat dikembangkan sebagai pupuk hayati yang mendukung pertanian berkelanjutan. Salah satu di antaranya adalah

Azotobacter yang memfiksasi N_2 (Wong *et al.*, 1995) dan memproduksi hormon (Gholami *et al.*, 2009). Hormon penting yang diproduksi oleh *Azotobacter* adalah sitokinin dan ditemukan pada media pertumbuhan *A. vinelandii* (Taller and Wong, 1989). dan *A. chroococcum* (Hindersah *dkk.*, 2003).

Saat ini, biakan murni *Azotobacter* telah digunakan sebagai pupuk hayati dan telah menjadi bagian dalam komposisi sejumlah pupuk organik cair. Produksi inokulan cair biasanya dilakukan pada media kimia terdefinisi dengan harga relatif mahal. Untuk menekan harga pupuk hayati *Azotobacter* tanpa menurunkan kualitas inokulan diperlukan media produksi inokulan cair yang relatif murah dan mudah didapatkan. Media ini harus tetap mendukung pertumbuhan sel, fiksasi N, dan produksi fitohormon.

Azotobacter adalah bakteri heterotrof yang memerlukan bahan organik sebagai sumber karbon dan energi. Bakteri ini juga dapat tumbuh di media dengan nitrogen (Holt *et al.*, 1994). Energi aktivasi Fiksasi N_2 diturunkan dengan biokatalisator nitrogenase yang aktivitasnya tergantung dari logam Fe dan Mo (Sprent and Sprent, 1991). Pada media Ashby bebas N yang umum digunakan untuk *Azotobacter* tidak mengandung kedua logam tersebut. Sebagai pengganti media terdefinisi di atas, dapat digunakan antara lain pupuk organik cair (POC). Pupuk ini mengandung bahan organik, unsur hara makro C, N, P dan K juga unsur hara mikro Fe, Mn, Cu, Zn, Co, Mo dan B yang akan mendukung pertumbuhan *Azotobacter* tetapi selalu mengandung N meskipun dalam konsentrasi yang rendah. Keberadaan N dengan konsentrasi rendah diawal pertumbuhan dapat mempercepat pertumbuhan sel bakteri sebelum memfiksasi nitrogen dan memproduksi hormon. POC juga mengandung Fe dan Mo sebagai kofaktor penting nitrogenase.

Penelitian mengenai pertumbuhan *Azotobacter* di dalam pupuk organik cair sebagai media produksi inokulan belum terlalu banyak dilakukan, demikian pula dengan peran pupuk organik cair terhadap

pertumbuhan sel *Azotobacter* dalam kultur cair terkendali. Oleh karena itu, penelitian produksi inokulan *Azotobacter* dalam POC dirasakan cukup penting sebagai upaya produksi POC yang lebih ekonomis, yang selanjutnya diharapkan dapat meningkatkan penggunaan POC. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pupuk organik cair sebagai media alternatif pengganti media kontrol Ashby dalam meningkatkan jumlah sel, kandungan N- Total dan hormon sitokinin dalam produksi inokulan cair *A. chroococcum*.

METODOLOGI

Penelitian dilaksanakan dari bulan April sampai dengan Juni 2011 di Laboratorium Biologi dan Bioteknologi Tanah Unpad. Analisis N dilakukan di Laboratorium Kesuburan dan Nutrisi Tanaman Unpad dan kuantifikasi sitokinin dilakukan di Lembaga Ilmu Penelitian Indonesia Bogor. Penelitian laboratorium ini menguji dua jenis pupuk organik cair (POC) yang mengandung unsur hara makro utama N, P dan K serta logam esensial Fe dan Mo. (Tabel 1). Isolat *Azotobacter chroococcum* yang diisolasi dari rizosfer jagung adalah koleksi Laboratorium Biologi dan Bioteknologi Tanah, Fakultas Pertanian, Unpad.

Penelitian dirancang dalam Rancangan Acak Lengkap yang terdiri atas tiga perlakuan yang diulang enam kali. Dalam penelitian ini jenis media yang diuji adalah Media Kontrol Ashby, POC-1 dan POC-2. Ke dalam masing-masing tabung erlenmeyer ditambahkan 30 ml media Ashby maupun kedua jenis pupuk organik cair 10% dan disterilkan dengan otoklaf pada $121^{\circ}C$. Satu malam setelah sterilisasi ke dalam tabung ditambahkan 10% (3 ml) inokulan cair *A. chroococcum* yang berasal dari biakan murni di dalam agar miring berumur 3 hari. Kultur diinkubasi di atas pengocok dengan kecepatan 115 rpm pada suhu kamar selama 96 jam.

Pengamatan dilakukan terhadap 1) Populasi sel *Azotobacter* (CFU ml^{-1}) setiap 24 jam, 2) Kandungan Nitrogen *Azotobacter*

(%) pada 72 jam setelah inkubasi dan 3) Produksi Hormon Sitokinin *Azotobacter* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pada 72 jam. Pengujian perbedaan pengaruh rata-rata perlakuan dilakukan dengan uji F pada taraf 5%. Apabila

perbedaan rata-rata perlakuan berpengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf 5% (Gasperz, 1991).

Tabel 1. Komposisi unsur hara makro dan logam esensial POC-1 dan POC-2

Parameter	Pupuk Organik Cair		Metode
	POC-1	POC-2	
C-organik (%)	4,23	5,12	Walkey & Black
pH	7,5	5,37	Elektrometry, pH meter (1:5)
N (%)	0,14	0,16	Kjeldahl, titrimetry
P ₂ O ₅ (%)	0,65	0,34	Oksidasi basah, HNO ₃ + HClO ₄ , molibdovanadat, spectrometry
K ₂ O (%)	1,02	1,57	Oksidasi basah, HNO ₃ + HClO ₄ , AAS -Flamephotometry
Fe (mg/kg)	251,0	376,25	Oksidasi basah, HNO ₃ + HClO ₄ , AAS
Mo (mg/kg)	0,08	2,20	Oksidasi basah, HNO ₃ + HClO ₄ , AAS

Analisis Kepadatan Sel

Kepadatan sel *A. chroococcum* pada media ditentukan dengan mengukur kepadatan sel dalam kultur cair pada awal pembuatan inokulan bakteri dan setiap 24 jam dengan metode langsung menggunakan bilik hitung (*hemocytometer*) selama empat hari.

Analisis Kandungan N- Total

Sebanyak 1 ml kultur bakteri *A. chroococcum* akan dipisahkan, sehingga didapatkan cairan supernatan melalui proses sentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dikoleksi untuk analisis kandungan nitrogen total setelah 72 jam inkubasi dengan menggunakan metode Kjeldahl.

Analisis Hormon

Analisis hormon sitokinin dilakukan dengan mengambil 10 ml kultur untuk selanjutnya diekstraksi dengan metanol sebelum kandungan fitohormon diukur dengan metode HPLC (Hindersah *dkk.*, 2003), analisis dilakukan setelah 72 jam inkubasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jenis media berpengaruh terhadap kepadatan sel *A. chroococcum*. Dengan menggunakan bilik hitung, kepadatan sel sebelum inkubasi adalah $7,04 \times 10^7$ CFU mL⁻¹, meningkat menjadi $15,78 \times 10^7$ CFU mL⁻¹ setelah 72 jam inkubasi dan pada akhir inkubasi (96 jam) menjadi $7,81 \times 10^7$ CFU mL⁻¹ (Tabel 2).

Pertumbuhan bakteri dari waktu ke waktu dapat digambarkan sebagai perbandingan jumlah sel dengan waktu yang disebut kurva pertumbuhan. Pada penelitian ini, fase lag tidak terdeteksi, mungkin ada di antara 0-24 jam setelah inkubasi. Namun penelitian Juarez *et al.* (2005) tidak memperlihatkan adanya fase lag antara 0-24 jam setelah inkubasi baik untuk *A. chroococcum* tanpa maupun dengan sumber C tambahan berupa campuran 0,3% Asam Protocatechuic dan 0,3% Asam p-hidroksibenzoat. Ini memperlihatkan bahwa komposisi maupun volume media pertumbuhan mendukung proliferasi sel.

Tabel 2. Pengaruh Jenis Media terhadap Kepadatan Sel *A. chroococcum*

Perlakuan	Kepadatan Sel <i>A. chroococcum</i> (10^7 CFU ml ⁻¹)				
	Sebelum inkubasi	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
Media Ashby	6,2 a	16,1 a	22,0 a	18,7 a	10,8 b
POC-1	8,4 a	14,2 a	20,2 a	15,7 a	6,7 a
POC-2	6,5 a	13,9 a	19,4 a	12,5 a	5,9 a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata menurut Uji Duncan pada taraf 5%.

Hasil analisis statistik memperlihatkan bahwa kepadatan sel *A. chroococcum* di media Ashby pada 48 jam inkubasi lebih tinggi daripada kepadatan sel di media POC. Tetapi perbedaannya relatif kecil dan tidak mencapai satu desimal, dengan demikian kedua jenis POC mampu mendukung pertumbuhan sel bakteri meskipun kapasitasnya lebih rendah dibandingkan media Ashby. Hal ini disebabkan karena komposisi nutrisi dalam POC kurang sesuai untuk *Azotobacter*, meskipun mengandung hampir semua unsur hara yang diperlukan bakteri.

Penurunan populasi terlihat mulai pada 72 jam setelah inkubasi dan terus menurun sampai 96 jam. Jika pada jam ke 96 populasi bakteri di media Ashby masih 10^8 cfu mL⁻¹ maka pada POC populasi kembali ke sekitar 10^7 cfu mL⁻¹. Kedua jenis POC mengandung elemen yang hampir sama meskipun kuantitasnya berbeda, sehingga dapat digunakan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Media Ashby mengandung karbohidrat berupa manitol dan glukosa (Page, 1986) yang relatif tersedia sebagai sumber karbon. POC mengandung bahan organik, berupa C-organik masing-masing 5,12 % dan 4,23 % yang dapat dimanfaatkan oleh *Azotobacter* untuk sumber karbon. Namun, karena POC berasal dari bahan organik, maka sebagian bentuk bahan organik di dalam POC tersedia dengan lambat untuk mikroba.

Azotobacter maupun bakteri lainnya mempergunakan nutrisi yang tersedia dalam media untuk mendukung proses metabolismenya (Khairani, 2009). Dalam penelitian ini kedua POC dapat digunakan

sebagai media perbanyakan *Azotobacter* meskipun mengandung N, karena *Azotobacter* pemfiksasi N₂ tetap tumbuh dengan baik jika ada N tersedia seperti NH₃ (Wu *et al.*, 1987).

Kandungan N- Total dalam Media *Azotobacter chroococcum*

Jenis media tidak berpengaruh nyata terhadap kandungan nitrogen di dalam kultur cair setelah 72 jam inkubasi. Supernatan pada setiap kultur mengandung nitrogen yang sama banyaknya (Tabel 3), yaitu sekitar 0,02 %. Dengan pengenceran 10% maka kadar N di POC menjadi sekitar 0,01%. Peningkatan kadar N sampai dua kali lipat di media POC menunjukkan bahwa fiksasi N terjadi di media ini.

Tabel 3. Pengaruh Jenis Media terhadap Kandungan N- Total di dalam kultur

Perlakuan	Nitrogen Total (%)
Ashby	0,027 a
POC-1	0,022 a
POC-2	0,025 a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata menurut Uji Duncan pada taraf 5%.

Dalam penelitian ini, nitrogen yang disekresikan oleh *Azotobacter* dalam supernatan kultur dengan Ashby adalah N hasil fiksasi. Namun N di dalam kultur dengan media POC dapat berasal dari N POC selain dari N hasil fiksasi. Nitrogen yang terikat pada sel akan dilepas dalam bentuk organik (NH₃) sebagai sekresi atau setelah

bakteri tersebut mati (Isminarni *et al.*, 2007). Tabel 4 memperlihatkan bahwa kandungan N-Total pada setiap media tidak berbeda, tetapi fiksasi N₂ oleh *Azotobacter* dapat berbeda jika dianggap sebagian N di dalam POC berasal dari POC itu sendiri. Dalam POC yang mengandung N, *Azotobacter* memfiksasi N pada 72 jam setelah inkubasi, saat N dari POC sudah habis untuk memperbanyak sel.

Fiksasi N di media POC dapat terjadi setelah N di dalam media habis digunakan untuk perbanyak sel. Konsentrasi nitrogen dalam ketiga jenis media tidak diukur pada 24 dan 48 jam setelah inkubasi, sehingga tidak diketahui dengan pasti saat nitrogen benar-benar tidak terdapat di dalam kultur, dimana efek penghambatan fiksasi N telah berhenti. Gutierrez *et al.* (2011) menjelaskan bahwa fiksasi N₂ oleh *A. chroococcum* berkurang atau benar-benar terhambat saat sumber nitrogen alternatif tersedia. Efek penghambatan oleh N berhenti ketika sumber nitrogen telah habis di dalam media (Cejudo and Paneque (1986). Fiksasi N₂ pada media POC juga dapat berlangsung saat konsentrasi N di dalam kultur rendah.

Fiksasi N mungkin lebih efektif pada media POC yang mengandung unsur hara mikro, karena proses ini memerlukan molibdenum, besi, kalsium dan kobal dalam jumlah yang cukup (Imas *dkk.*, 1989), dalam fiksasi nitrogen diperlukan enzim nitrogenase, umumnya struktur nitrogenase memiliki enzim yang terdiri atas 2 kompleks protein, yaitu protein MoFe pada nitrogenase I dan protein Fe pada nitrogenase II (Brock and Madigan, 1991).

POC-1 mengandung 376,25 ppm Fe dan 2,2 ppm Mo, POC-2 mengandung 251 ppm Fe dan 0,08 Mo, sedangkan Ashby tidak mengandung Fe dan Mo. Semua kelompok mikroorganisme pemfiksasi nitrogen membutuhkan Mo dalam jumlah sangat kecil. Mo adalah unsur yang sangat diperlukan dalam proses fiksasi nitrogen, karena berpengaruh terhadap nitrogenase. Logam Mo adalah unsur esensial yang diperlukan sebagai metaloenzim (kofaktor) dalam enzim

nitrogenase dan tidak dapat digantikan oleh unsur kimia lain (Hawab, 2007). Fiksasi nitrogen yang optimum oleh *A. vinelandii* membutuhkan Mo sebesar 0,001 ppm (McKee, 2003), sedangkan protein Fe diperlukan untuk melindungi nitrogenase dari pengaruh buruk oksigen (Smith *et al.*, 1987).

Kandungan Hormon Sitokinin dalam Media *Azotobacter chroococcum*

Kultur cair *A. chroococcum* yang telah diinkubasi selama 72 jam mengandung sitokinin, memperlihatkan kemampuan bakteri dalam mensintesis dan mensekresikan hormon tersebut. Jenis media berpengaruh nyata terhadap produksi hormon sitokinin (Tabel 3).

Tabel 3. Pengaruh Jenis Media terhadap Kandungan Hormon Sitokinin dalam Media *A. Chroococcum*

Perlakuan	Hormon Sitokinin ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Media Ashby	21,73 b
POC-1	19,43 a
POC-2	18,68 a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata Menurut Uji Duncan pada taraf 5%.

Sejumlah penelitian telah membuktikan kemampuan rizobakteri *Azotobacter chroococcum* dalam memproduksi hormon terutama sitokinin (Hindersah *et al.*, 2003). *A. vinelandii* mensintesis sitokinin jenis trans-zeatin, isopentenyladenosine dan isopentenyladenine pada fase stationer, 72 jam setelah inkubasi (Taller and Wong, 1989). Hasil penelitian Timmusk *et al.*, (1999) menunjukkan bahwa hormon sitokinin diproduksi oleh bakteri PGPR pada logaritmik akhir atau fase stationer pada media yang terdefinisi begitu juga *Azotobacter*.

Pada fase log nutrisi dalam media mulai berkurang, bakteri akan menggunakan glukosa sebagai sumber energi sisa dalam media untuk meningkatkan enzim

metabolisme (Wong *et al.*, 1995) yang akan digunakan untuk produksi hormon, setelah 72 jam inkubasi kultur *Azotobacter* telah memasuki fase deklinasi (Gambar 2). Pada fase tersebut media Ashby lebih menginduksi produksi sitokinin, namun pada media POC pun *Azotobacter* tetap dapat menghasilkan sitokinin. Pada penelitian ini, fase logaritmik akhir (Gambar 2) terjadi setelah 48 jam inkubasi, namun konsentrasi sitokinin tidak diukur. Diyakini bahwa setelah 48 jam inkubasi konsentrasi sitokinin lebih tinggi daripada yang terukur setelah 72 jam inkubasi.

KESIMPULAN

Baik media Ashby maupun media alternatif Pupuk Organik Cair mendukung pertumbuhan sel bakteri meskipun pertumbuhan sel sudah mulai menurun pada jam ke 72 dengan penurunan terkecil pada media Ashby. Media Ashby dapat lebih meningkatkan jumlah sel sampai jam ke 48 dan lebih mendukung produksi hormon sitokinin. Kandungan N di dalam ketiga jenis media tidak berbeda nyata, namun ada peningkatan kadar N sampai dua kali lipat di media POC. Peningkatan ini menunjukkan bahwa fiksasi N terjadi di media ini, terjadi setelah N habis untuk asimilasi sel. Penelitian ini membuktikan bahwa POC dapat digunakan sebagai media perbanyakan mikroba kecuali jika produksi fitohormon menjadi tujuan utama. Optimasi media POC dengan penambahan unsur hara agar ketersediaannya optimal untuk bakteri perlu dilakukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterimakasih pada penyedia dana penelitian, PT. Multiguna Indah Lestari untuk rangkaian penelitian penggunaan pupuk organik cair sebagai media pertumbuhan mikroba potensial tanah.

DAFTAR PUSTAKA

- Cejudo, F and A. Paneque. 1986. Short-Term Nitrate (Nitrite) Inhibition of Nitrogen Fixation in *Azotobacter chroococcum*. *Journal of Bacteriology*. 165: 240-243.
- Gaspersz, V. 1991. Metode Perancangan Percobaan. CV. Armico, Bandung.
- Gholami, A., Shahsavani S and S. Nezarat. 2009. The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination, Seedling Growth and Yield of Maize. *World Academy of Science, Engineering and Technology*.
- Gutierrez, I., Ana B. T and M. Nubia. 2011. Optimising Carbon and Nitrogen Sources for *Azotobacter chroococcum* Growth. *African Journal of Biotechnology*. 10: 2951-2958.
- Hawab. 2007. Ketergantungan Pertumbuhan dan Aktivitas Fiksasi Nitrogen oleh *Azotobacter vinelandi* terhadap Unsur Molibdenum (Mo) dan Wolfram (W) Pada Media Cair Modifikasi Burk. *Jurusan Kimia. IPB, Bogor*.
- Hindersah, R., Arief, D.H., Sumarni Y. dan T. Warsa. 2003. Produksi Hormon Sitokinin oleh *Azotobacter*. *Prosiding Kongres dan Seminar Nasional HITI, Padang*. Hal. 549-555.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Shaley J.T and S.T. William. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. William and Wilkins, Baltimore.
- Imas, T., Hadioetomo, R. S., Gunawan A. W. dan Y. Setiadi. 1989. *Mikrobiologi Tanah II*. Departmen Pendidikan dan Kebudayaan. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Isminarni, F., Wedhastri, S., Widada, J dan B. H. Purwanto. 2007. Penambatan Nitrogen dan Penghasil Indol Asam Asetat oleh Isolat-Isolat *Azotobacter* pada pH Rendah dan Alumunium Tinggi. Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan. 7: 23-30.
- Khairani, G. 2009. Isolasi dan Uji Kemampuan Bakteri Endofitik Penghasil Hormon IAA dari Akar tanaman Jagung (*Zea mays* L.). Laporan Penelitian Universitas Sumatera Utara. Medan.
- McKee, H. S. 2003. Nitrogen Metabolisme in Plants. Division of Plant Industry Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Canberra, Australia.
- Page, W. J. 1986. Sodium-Dependent Growth of *Azotobacter chroococcum*. Applied and Environmental Microbiology. 51: 510-514.
- Smith, R. L., Van Baalen, C and F. R. Tabita. 1987. Alteration of the Fe Protein of Nitrogenase by Oxygen in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain CA. Journal of Bacteriology. 169: 2537-2542.
- Sprent, J.I and Sprent. P. 1990. Nitrogen Fixing Organisms, Pure and Applied Aspects. Chapman and Hall, London.
- Taller, B.J and T.Y. Wong. 1989. Cytokinins in *Azotobacter vinelandii* Culture Medium. Applied and Environmental Microbiology. 55: 266-267.
- Timmusk, S., Nicander, B., Granhal, U. and E. Tillberg. 1999. Cytokinin Production by *Paenibacillus polymyxa*. Soil Biology and Biochemistry. 31: 1847-1852.
- Wong, T. Y., Pei, H., Bancroft, K. and G.W. Childers. 1995. Diauxic Growth of *Azotobacter vinelandii* on Galactose and Glucose: Regulation of Glucose Transport by Another Hexose. Applied Environmental Microbiology. 61: 430-433.
- Wu, J. W., Moreno, J and G. R. Vela. 1987. Growth of *Azotobacter vinelandii* on Soil Nurient. Applied Environmental Microbiology. 53:489-494.